TRASPLANTE DE TERAPIA CELULAR COMBINADA DE GRADO CLÍNICO DE CÉLULAS CON PEQUEÑOS PRODUCTOS QUÍMICOS NEUROPROTECTORES IPSC-DERIVA EN UN MODELO DE RATA PARA LA REGENERACIÓN DE SCI CENTRAL DE VÍA MEDULAR

Dra. Victòria Moreno Manzano
Centro de Investigación Príncipe Felipe - València

1. Resumen

Actualmente carecemos de tratamientos efectivos para la pérdida funcional asociada con la lesión de la médula espinal (LME). En este estudio, evaluamos una terapia combinada que comprende células madre neurales humanas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC-NSC), células madre mesenquimales humanas (MSC) y un nanoconjugado de poliacetal-curcumina sensible al pH (PA-C) que permite la liberación sostenida de curcumina. El análisis *in vitro* demostró que el tratamiento con PA-C protegió a las iPSC-NSC del daño oxidativo, mientras que el cocultivo de MSC evitó la activación del factor nuclear κB (NF-κB) inducida por lipopolisacáridos en iPSC-NSC. Evaluamos la combinación de administración de PA-C en el espacio intratecal en un modelo de rata de SCI contusivo con trasplante de células madre. Si bien no pudimos observar mejoras significativas en la función locomotora (escala BBB) en los animales tratados, el análisis histológico reveló que los animales tratados con PA-C- o PA-C e iPSC-NSC+MSC mostraron cicatrices significativamente más pequeñas, mientras que el tratamiento con PA-C e iPSC-NSC+MSC indujo la conservación de axones positivos para tubulina β-III. El trasplante de iPSC-NSC+MSC fomentó la preservación de las motoneuronas y los tractos mielinizados, mientras que el tratamiento con PA-C polarizó la microglía en un fenotipo antiinflamatorio. En general, la combinación de trasplante de células madre y tratamiento con PA-C confiere mayores efectos neuroprotectores en comparación con los tratamientos individuales para su aplicación en lesiones medulares agudas.

2. Resultados

El tratamiento con PA-C aumenta la viabilidad de las iPSC-NSC, mejora la elongación de las neuritas, pero no logra inducir la diferenciación neuronal y glial: Anteriormente hemos descrito que el conjugado de poliacetal-curcumina (PA-C, carga de curcumina del 3,8 % p/v) mostró una citotoxicidad significativamente menor que la curcumina libre (C) en cultivos primarios de NSC de médula espinal de rata adulta (Requejo *et al.*, 2017). Para dilucidar si el PA-C influye en la viabilidad de las iPSC-NSC, realizamos un ensayo de viabilidad celular MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H -tetrazolio) a las 24 h después del tratamiento con concentraciones crecientes (hasta 20 μM) de PA-C a concentraciones equivalentes de curcumina. Descubrimos que las concentraciones evaluadas de PA-C no lograron inducir citotoxicidad en las iPSC-NSC; además, el tratamiento con PA-C aumentó significativamente la actividad metabólica de las iPSC-NSC de forma dependiente de la dosis en concentraciones superiores a 10 μM (Figura 1A). A continuación, estudiamos si un tratamiento de 24 h con PA-C 10 μM influyó en la determinación del destino de las iPSC-NSC. La tinción de células positivas para GFAP o beta-III-tubulina indicó que el tratamiento con PA-C no logró alterar la proporción de astrocitos y neuronas, respectivamente, en comparación con las iPSC-NSC tratadas con vehículo de control (Figura 1B). También analizamos los perfiles de expresión génica utilizando un RT2 Profiler PCR Array que incluye un conjunto de genes relacionados con la diferenciación neuronal, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de transcripción de oligodendrocitos (Olig2), SOX2,

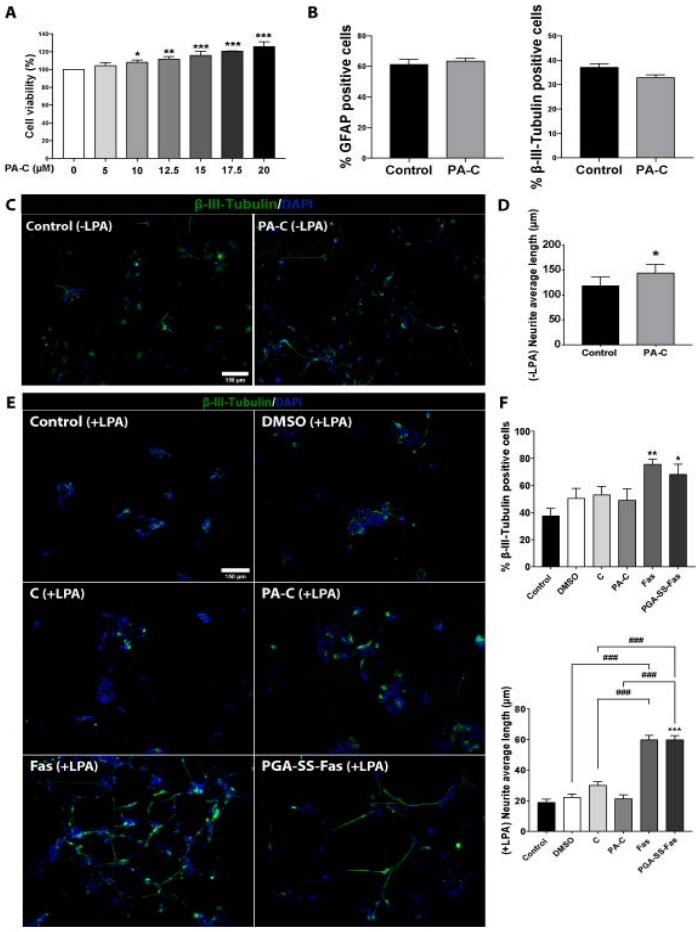


Figura 1. C-PA previene la muerte cellular de iNSC; y diferenciación cellular

Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1 (ASCL1), el receptor de dopamina D2 (DRD2) y genes relacionados con la apoptosis como el receptor de adenosina A1 y BCL2. El tratamiento con PA-C no logró influir en la expresión de los genes implicados en la apoptosis, lo que concuerda con los resultados de los ensayos de citotoxicidad (Figura 1A). Además, de este grupo selecto de genes, solo la expresión de DRD2 se reguló significativamente después del tratamiento con PA-C (*$p<0,05$ en comparación con las iPSC-NSC tratadas con vehículo de control), lo que indica que el tratamiento con PA-C no indujo significativamente la diferenciación neural de las iPSC-NSC. Estudios previos establecieron que el tratamiento con PA-C indujo el crecimiento de neuritas. Mientras que la incubación de iPSC-NSC con 10 μM PA-C durante 24 h no logró inducir una diferenciación neural significativa, encontramos que el tratamiento con PA-C indujo significativamente la elongación de neuritas en células beta-III-tubulina positivas (Figura 1C-D). También evaluamos la relevancia funcional de la elongación de neuritas inducida por el tratamiento con PA-C en un entorno inhibitorio al tratar iPSC-NSC con ácido lisofosfatídico (LPA), que activa el Rho/ROCK e induce la retracción del cono de crecimiento y el colapso de las neuritas. Empleamos fasudil libre (Fas), un conocido inhibidor de la quinasa *rho*, y una forma nanoconjugada de fasudil (PGA-SS-Fas) como controles positivos para elongación de neuritas. De manera similar a la curcumina, anteriormente hemos informado que la conjugación de polímeros mejoró la estabilidad del fasudil y apoyó la liberación sostenida, lo que mejoró la actividad neuroprotectora y regeneradora del fasudil en modelos SCI. Mientras que el tratamiento con PGA-SS-Fas o Fas (Figura 1E-F) permitió un aumento significativo en la elongación axonal en presencia de LPA, no encontramos diferencias después del tratamiento de iPSC-NSC con PA-C (Figura 1D) o C (Figura 1E-F). Las imágenes representativas de la inmunotinción de beta-III-tubulina en ausencia de tratamiento con LPA muestran elongación de neuritas después del tratamiento con PA-C (Figura 2C), extensiones neurales abundantes y largas después del tratamiento con PGA-SS-Fas (Figura 1E-F) y la ausencia de cambios morfológicos en las iPSC-NSC tratadas con PA-C en presencia de LPA en comparación con el control iPSC-NSC tratado con vehículo (Figura 1E-F).

PA-C y PA-C combinados con el trasplante de iPSC-NSC+MSC preservan las fibras beta-III-tubulina positivas, limitan el tamaño de la cicatriz inhibitoria y aumentan el número de sinapsis funcionales después de la LME: Analizamos las secciones longitudinales de la médula espinal, incluido el epicentro de la lesión y

segmentos rostrales y caudales a la lesión, mediante inmunotinción doble con beta-III-tubulina (imágenes representativas que se muestran en la Figura 2A; paneles de la izquierda, verde) y GFAP (paneles de la derecha, rojo) para cuantificar la preservación de la fibra nerviosa. La cuantificación de la tinción de beta-III-tubulina (Figura 2B; panel superior) reveló un área positiva significativamente mayor presente en animales que recibieron tratamiento con iPSC-NSC+MSC+PA-C que en los animales de control o aquellos que recibieron iPSC-NSC y MSC, pero no en comparación con el tratamiento con PA-C. El tratamiento con PA-C provocó un área positiva de beta-III-tubulina significativamente más grande que los tratamientos con iPSC-NSC o MSC. Cabe destacar que observamos una reducción significativa en el número de fibras neuronales después del tratamiento con iPSC-NSC o MSC en comparación con el control o el tratamiento con iPSC-NSC+MSC+PA-C.

También evaluamos el tamaño de la cicatriz inhibitoria cuantificando la falta de tinción de GFAP, expresando este valor como un porcentaje del área total de tejido cuantificado (Figura 2A – panel derecho, línea discontinua; Figura 2B – panel inferior). Los tratamientos con PA-C e iPSC-NSC+MSC+PA-C redujeron significativamente el área de la cicatriz en comparación con otros tratamientos. El tratamiento con iPSC-NSC dio como resultado un área de cicatriz aumentada en comparación con el control; sin embargo, los tratamientos con iPSC-NSC+MSC o MSC no lograron inducir alteraciones significativas.

Para evaluar la preservación de las sinapsis funcionales, cuantificamos los fondos sinápticos en los somas neuronales colocalizando la sinaptofisina y NeuN para aquellos tratamientos que proporcionaron mejores resultados en el análisis anterior de preservación de la fibra neuronal (la Figura 2C muestra imágenes representativas de cada una de las tinciones probadas del grupo de control). El análisis de las células positivas para NeuN conservadas, expresadas como porcentaje de área positiva para NeuN, demostró un aumento significativo después del tratamiento con PA-C en comparación con el control (Figura 2D; panel izquierdo). Además, la cuantificación de la colocalización (sinaptofisina/NeuN+) normalizada al área positiva total de NeuN demostró un aumento significativo después del tratamiento con PA-C o iPSC-NSC+MSC+PA-C en comparación con el control (Figura 2D; panel derecho).

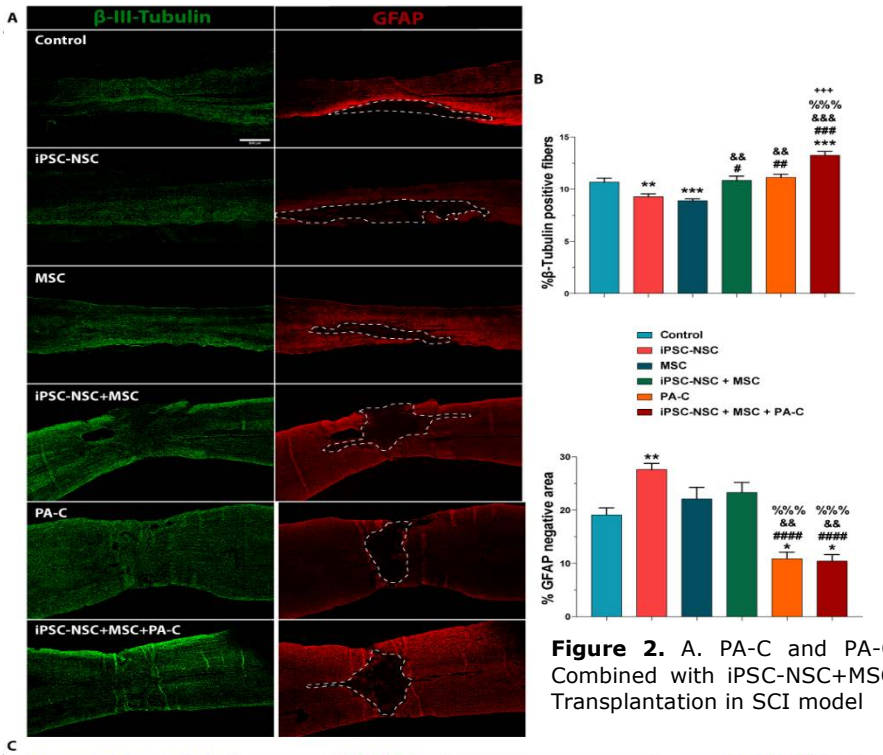
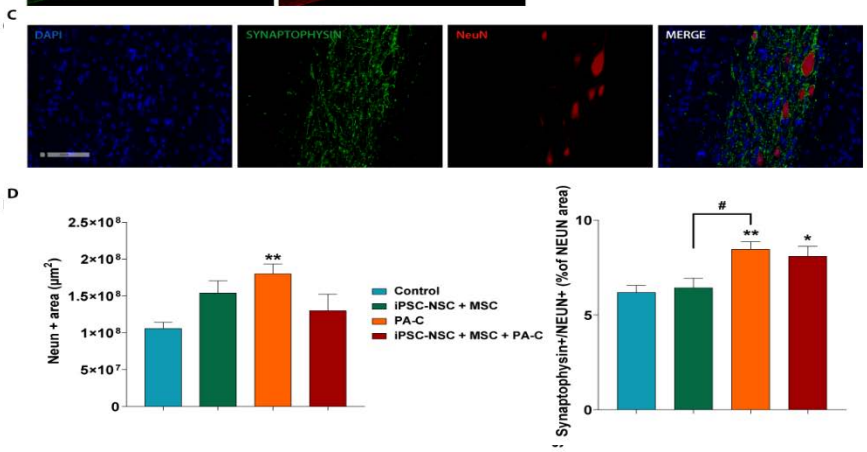


Figure 2. A. PA-C and PA-C Combined with iPSC-NSC+MSC Transplantation in SCI model



El trasplante de PA-C combinado con iPSC-NSC+MSC induce la preservación del tejido medular después de una LME:
Determinamos la preservación de la materia blanca mediante la tinción Luxol Fast Blue (LFB): la LFB se une a las lipoproteínas de la vaina de mielina y permite la cuantificación de las áreas mielinizadas restantes. El análisis por LFB (Figura 3A-B) demostró que los tratamientos con iPSC-NSC y MSC aumentaron la preservación de la materia blanca de la médula espinal en comparación con el control y el tratamiento con PA-C. Además, el tratamiento con iPSC-NSC+MSC+PA-C también aumentó la conservación de la sustancia blanca en comparación con el control y el tratamiento con PA-C.

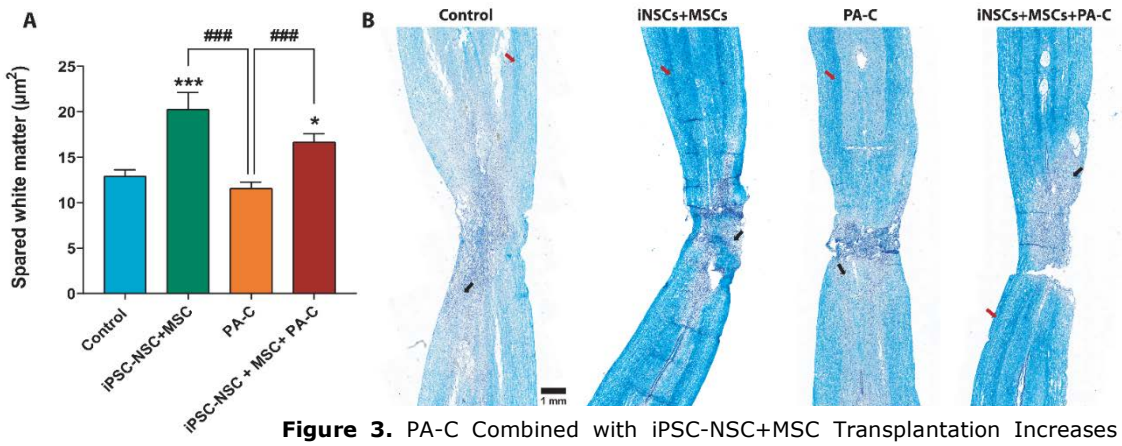


Figure 3. PA-C Combined with iPSC-NSC+MSC Transplantation Increases White Matter Sparing

PA-C y PA-C combinados con el trasplante de iPSC-NSC+MSC promueven la polarización de la microglía hacia un perfil antiinflamatorio: A continuación, evaluamos la posible actividad antiinflamatoria *in vivo* de PA-C o iPSC-NSC+MSC+PA-C mediante el estudio de la presencia de microglía activada con perfil antiinflamatorio a través de la colocalización de la expresión de IBA1 (marcador de microglía) y Arginasa-1 (Arg1) (Figura 4A-B). Después de cuantificar el porcentaje de células que expresan IBA1, Arg1 o IBA1 y Arg1 (Figura 4C), encontramos que ambos tratamientos (PA-C o iPSC-NSC+MSC+PA-C) aumentaron la presencia de microglía antiinflamatoria (IBA1+ /Arg1+) en la médula espinal nueve semanas después de la LME.

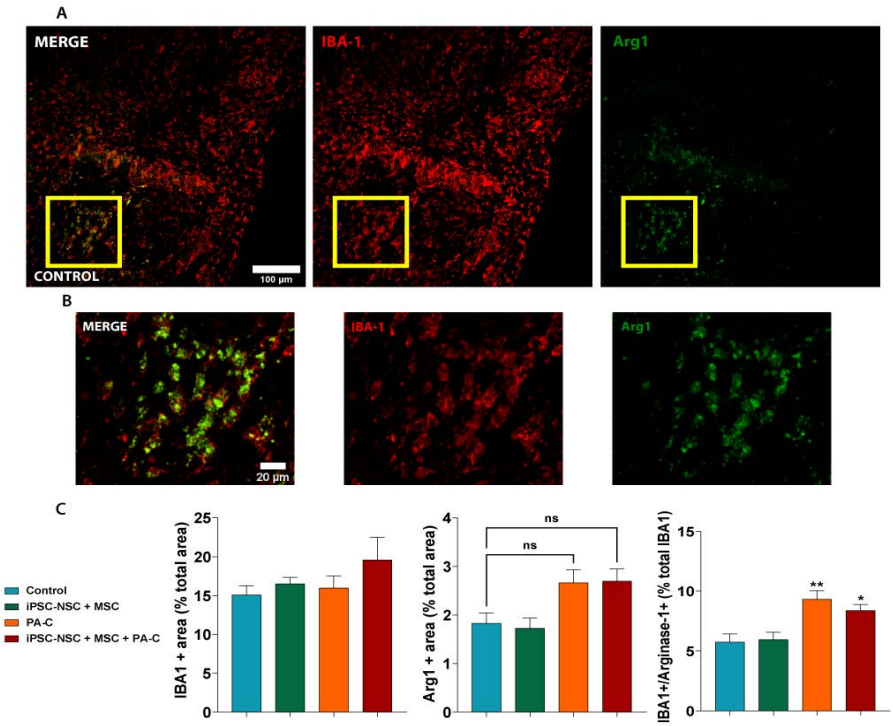


Figure 4. PA-C and PA-C Combined with iPSC-NSC+MSC Transplantation Prompt Microglial Polarization Towards an Anti-Inflammatory Profile

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

La compleja naturaleza patológica de las lesiones medulares traumáticas requiere la implementación de una perspectiva terapéutica multifacética y versátil en cuanto al desarrollo de tratamientos eficaces. La aplicación de estrategias únicas basadas en el trasplante celular de células mesenquimales (MSC) o células precursoras neurales (NPC) ya ha mostrado efectos beneficiosos en aplicaciones clínicas. En este trabajo hemos logrado mejorar una combinación de tratamientos ya probados en aplicaciones individuales. Dentro de este proyecto hemos demostrado que el tratamiento combinado que incluye PA-C (una conjugación estable y soluble en agua de curcumina), iPSC-NSC y MSC proporciona efectos inmunomoduladores y neuroprotectores para prevenir la degeneración axonal, la muerte neuronal y la pérdida de conectividad neuronal. Además, esta estrategia combinatoria redujo el área de la lesión y evitó la expansión de la cicatriz glial en etapas crónicas, de modo que proporciona un enfoque versátil y clínicamente relevante para el futuro cercano que se ha implementado en el tratamiento de la LME aguda.

4. Bibliografía científica generada

Álvarez-Palomo AB, Requena-Osete J, Delgado-Morales R, Moreno-Manzano V, Grau-Bové C, Tejera AM, Otero MJ, Barrot C, Santos-Barriopedro I, Vaquero A, Mezquita-Pla J, Morán S, Naya CH, Garcia-Martínez I, Pérez FV, Blasco MA, Esteller M, Edel MJ. *A synthetic mRNA cell reprogramming method using CYCLIN D1 promotes DNA repair generating improved genetically stable human induced pluripotent stem cells.* Stem Cells. 2021 Feb 23. doi: 10.1002/stem.3358.

Bonilla P, Hernández J, Giraldo E, González-Pérez MA, Alastrué-Agudo A, Elkhenany H, Vicent MJ, Navarro X, Edel M, Moreno-Manzano V. *Human-Induced Neural and Mesenchymal Stem Cell Therapy Combined with a Curcumin Nanoconjugate as a Spinal Cord Injury Treatment.* Int J Mol Sci. 2021 May 31;22(11):5966. doi: 10.3390/ijms22115966.

Tesis doctoral:
"Human-Induced Neural and Mesenchymal Stem Cell Therapy Combined with a Curcumin Nanoconjugate as a Spinal Cord Injury Treatment". Estudiante doctoral: Pablo Bonilla (en preparación, fecha prevista de defensa: diciembre de 2021).